



TITLE:

静脈内注入同種脾細胞の臓器内分布

AUTHOR(S):

高見, 武夫

CITATION:

高見, 武夫. 静脈内注入同種脾細胞の臓器内分布. 日本外科宝函 1969, 38(4): 633-637

ISSUE DATE:

1969-07-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/207565>

RIGHT:

静脈内注入同種脾細胞の臓器内分布

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：木村忠司教授）

高松赤十字病院外科（院長：小神公一博士）

高 見 武 夫

〔原稿受付：昭和44年4月2日〕

The Distribution of Intravenously Injected Homologous Spleen Cells

by

TAKEO TAKAMI

The 2nd Division of Surgery, Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. CHUJI KIMURA)

Department of Surgery, Takamatsu Red-Cross Hospital

It would obviously be of great interest to determine the distribution of macrophages obtained from the spleen, liver and other areas. The spleen cells are obvious examples. Spleen cells were labelled with ^{51}Cr . The labelled spleen cell suspensions prepared from five donor rabbits were injected into ten homologous recipients. The viability of the cells were assessed by their ability to exclude Trypan Blue. Their distribution was determined at 24 hours after injection. The spleen cells accumulated predominantly in the liver and spleen. Compared with Kupffer cells and peritoneal macrophages, spleen cells show a lesser tendency to accumulate in the liver. Approximately 2% of the injected spleen cells and Kupffer cells were found in the spleen and lung, but about 18% of injected peritoneal macrophages accumulated in these organs. Presumably these differences of distribution are attributed to different method of preparation of cell suspension.

緒 言

同種動物間に移入された網内系細胞のRecipient体内での分布状態は、悪性腫瘍の免疫療法や移植免疫反応の抑制等の研究に関連する興味ある問題である。各種網内系細胞の中、腹腔喰細胞及び肺泡喰細胞の静脈内注入後の臓器分布については Roser (1965)¹⁾及び Russell, Roser (1966)²⁾等の詳細な報告がみられ、骨髄細胞の分布については Gregusova 及び Hupka (1961)³⁾が、又 Kupffer 細胞の分布に関しては Roser (1968)⁴⁾が詳細な研究を行っている。

本実験では ^{51}Cr でラベルされた同種脾細胞を静脈内に注入し、Recipientの肺、肝、脾、腎、腸間膜根部リンパ節（以下リンパ節と略す）における分布状態を測定し、既に報告されている腹腔喰細胞、肺泡喰細胞、骨髄細胞及び Kupffer 細胞の分布状態と比較検討すると共に、若干の文献的考察を加えた。

実験方法及び材料

標識赤血球浮遊液の作製

正常成熟家兎（体重約2.0kg）5例の耳静脈より5.0 ml (ACD液を25%の割合で添加)を採血し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$

溶液1.0mlを加えて、37°C、30分間 incubate し、生理的食塩水にて3回洗滌して残余の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を除去した後、生理的食塩水を加えて全量5.0mlの ^{51}Cr ラベル赤血球浮遊液を作製した。尚、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ は生理的食塩水をもつて500 $\mu\text{C}/\text{ml}$ の濃度に稀釈した。又、放射能減衰表より実験当日の ^{51}Cr の放射能残存率を求めて計算の基礎とした。

標識脾細胞浮遊液の作製

前記の方法で作製した ^{51}Cr ラベル赤血球浮遊液5.0 mlを前回採血した同一家兎5例の耳静脈より注射した。48時間後、脱血屠殺して脾臓を摘出し重量を測定した後、小切片に細切しステンレス製2重細篩を通して圧出濾過した。得られた脾細胞を3回洗滌した後、生理食塩水で再度浮遊した。この浮遊液の一部をとり Scintillation Counterにて放射線量 (c.p.m.) を測定すると同時に Trypan Blue法によつて脾細胞の生存率を測定した。本法によれば脾細胞生存率は約70%であつた。最終的には、 ^{51}Cr 標識脾細胞浮遊液は約 1×10^7 ケ/mlの生存脾細胞を含むように調製した。

標識同種脾細胞の臓器内分布の測定

前記の方法で作製された ^{51}Cr 標識同種脾細胞浮遊液を成熟家兎 (体重約2.0 kg) 10例の耳静脈より注入した。10例中2例は3.0ml、8例は5.0mlを注入した。注入後24時間目に脱血屠殺して肺、肝、脾、腎、リンパ節を摘出し、夫々の切片について重量をはかり、Scintillation Counterで放射線量 (c.p.m.) を測定した。更に、測定値を各臓器の単位重量当りの放射線量に換算し、初期投与放射線量に対する分布百分率及び脾に対する他臓器の放射能比率を算出した。

成 績

脾細胞の放射線量

表1はラベル赤血球浮遊液作製時における $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ の放射能残存率及び使用時有効放射能を示す。臨床上是100~150 μC にて赤血球をラベルし得るが、本実験では実験過程及び測定機器の効率等による損失を充分に考慮して約2倍量の200~300 μC を使用した。

表1 ^{51}Cr の残存放射能及び投与時有効放射能

	1	2	3	4	5
放射能残存率 (%)	60.7	51.0	59.3	55.0	55.0
有効放射能 ($\mu\text{C}/\text{ml}$)	303.5	255	296.5	275	275

^{51}Cr ラベル赤血球浮遊液注射48時間後の摘出脾臓及び末梢血液中の残存放射線量は表2に示す通りである。脾細胞をラベルすることに関与しなかつた放射能を除外する意味から、脾放射線量と末梢血液中に残存している放射線量との差を Splenic Macrophage により摂取された有効放射能量として以後の実験値算出の基礎とした。

表3 ラベル脾細胞の受給関係

Donor	A	1, 2	Recipient
	B	3, 4	
	C	5, 6	
	D	7, 8	
	E	9, 10	

各種臓器における標識同種脾細胞の分布

標識同種脾細胞の Donor と Recipient は表3に示す

表2 摘出脾及び末梢血液中の放射線量 (c. p. m.) (48時間後)

		A		B		C		D		E	
		脾	血液	脾	血液	脾	血液	脾	血液	脾	血液
標本重量 (g)		0.2	1.2	0.2	1.0	0.6	2.0	0.3	1.8	0.3	1.6
放射線量	測定値	12140	21188	196294	6834	633738	46418	46418	135554	50706	38923
	バックグラウンド値	94	82	88	82	97	118	99	118	106	118
	有効値	12046	21106	196206	6752	633641	46300	46319	135436	50600	38805
単位重量当り放射線量		60230	17838	892246	6752	1056068	28601	185276	73208	168667	23807
脾有効放射線量		42392		885494		1027467		112068		144860	

組合せとなっており、Recipientの脾、肝、肺、腎、リンパ節及び末梢血液中における単位重量当りの放射線量(c.p.m.)を表4に示す。

各臓器内放射線量には夫々の臓器内に分布するMacrophageに摂取されなかつた⁵¹Crラベル同種脾細胞及び一旦摂取された後、再び放出されたものが含まれている為これらを除去する目的で各臓器の測定値から末梢血液中に残存している放射線量を減じた値を有効放射線量とした。従つて、末梢血液中残存放射線量以下の値のものは有意性なきものとして0と定めた。

同種脾細胞注射24時間後では、リンパ節には殆んど脾細胞は摂取されていなかつた。単位重量当り放射線量からみた同種脾細胞の臓器分布順位は(脾、肝、腎、肺)の順が10例中4例、(脾、肝、肺、腎)の順が10例中3例、(肝、脾、肺、腎)の順が10例中2例とな

り、10例中9例で脾と肝が優位を占めていた。

次に脾、肝、肺、腎の全重量についての放射線量分布百分率を算出すると表5に示す如く、各10例の平均値で脾1.8%、肝34.5%、肺1.8%、腎2.8%となり、これらの4臓器の合計は38.9%となる。成熟家兎の全血量は体重の5.5%⁵⁾として計算した。臓器全重量の分布百分率からみると、静注された同種脾細胞は肝に主として蓄積し、脾、肺、腎の蓄積量には大差を認めなかつた。

一方、単位重量当りの放射線量を各臓器内の放射能比率に換算すると表6に示す如く、10例中7例で脾肝比は1より大で、脾肺比、脾腎比、肝肺比は全例1より大で、肝腎比は10例中9例、肺腎比は10例中5例が1より大であつた。

表4 臓器別単位重量当り有効放射線量 (24時間後)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
脾	234	288	933	1116	7985	4846	165	928	658	638
肝	76	22	1285	1109	5959	5440	68	281	414	394
肺	30	7	424	464	2310	4024	0	26	55	257
腎	32	40	386	413	1804	2132	0	59	153	392
リンパ節	0	0	17	0	0	0	0	468	0	6
血液	12	27	19	187	223	288	466	122	47	35

表5 臓器別放射能分布百分率 (24時間後)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	標準偏差	標準誤差
脾	3.1	5.3	0.5	0.6	1.2	1.1	1.9	1.8	0.8	0.6	1.75	1.38	0.46
肝	28.3	10.6	22.9	27.7	54.8	77.3	1.4	44.9	31.2	30.5	34.5	19.2	6.39
肺	2.1	0.5	1.6	1.9	3.2	4.4	0	0.6	0.6	2.3	1.80	1.20	0.40
腎	2.8	5.1	0.8	2.4	3.9	2.5	0	2.4	2.4	5.5	2.80	1.62	0.54
計	36.3	21.5	25.8	32.6	63.1	85.2	3.3	49.7	35.0	38.9	38.95	18.5	7.03

表6 各臓器の単位重量当り放射能比率 (24時間後)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
脾 / 肝	3.1	13.1	0.7	1.0	1.3	0.9	2.4	3.3	1.6	1.6
脾 / 肺	7.8	41.1	2.2	2.4	3.5	1.2	—	35.6	11.9	2.5
脾 / 腎	7.3	7.2	2.4	2.7	4.4	2.2	—	15.7	4.3	1.6
肝 / 肺	2.5	3.0	3.0	2.4	2.6	1.4	—	10.8	7.5	1.5
肝 / 腎	2.4	0.6	3.3	2.7	3.3	2.6	—	4.8	2.7	1.0
肺 / 腎	0.9	0.2	1.1	1.1	1.2	1.9	—	0.4	0.4	0.7

考 按

アイソトープによるラベル脾細胞の静脈内投与実験において問題となるのは、1) 脾細胞をラベルする方法、2) ラベルされた脾細胞浮遊液の調製法及び 3) ラベル脾細胞の静注後、放射線量測定迄の時間の3点である。

この中、1)については ^{51}Cr ラベル赤血球を用いる方法が既に実験的にも、臨床的にも広く応用されているので問題はない。

2)については、Howard (1961)⁶⁾等の方法を用いたが、この方法では機械的に脾実質を篩く為にラベル脾細胞の中、注射時に生存しているのは約70%であった。ところで临床上、同種脾細胞を用いる場合には注入された脾細胞が Recipient の体内である期間生存している事が要求されるので、著者の実験で得られた生存率70%は不満足な値である。この点 Boeryd等⁷⁾が蛋白融解酵素及び Deoxyribonuclease を用いて胸腺や固形腫瘍から細胞を分離した方法では約95%が生存していたと報告している事は注目に値する。

3)の測定時間の問題については、Roser (1968)⁴⁾が Kupffer 細胞及び腹腔喰細胞を用いて経時的に臓器内分布率を測定した結果、静注後24時間以後は摂取率は一定した値を示すという成績を基にして、ラベル同種脾細胞静注後24時間目の測定値を用いた。尚本実験ではラベルされた脾細胞の分類及び死滅細胞や組織破壊産物の完全除去等の問題については問題にできなかった。しかし、臨床的使用にさいしては出来るだけこれらの不要物質を除去する事が望ましい。St. George, Friedmann 等⁸⁾(1954)はコロイド鉄を Kupffer 細胞に摂取させた後、これを強力な磁場を用いて他の成分から分離する方法を報告しているが、本法は複雑な装置と熟練した技術を要するのが難点である。Shortman⁹⁾(1965)は仔牛血清アルブミンの比重較差遠沈法を利用して細胞塊を浮遊する方法を用いて操作の簡素化と迅速化に成功した。更に、Roser⁴⁾(1968)は Pronase P 及び Deoxyribonuclease を含む酵素溶液をもつて肝を灌流後、仔牛血清アルブミンによる浮遊選別及び胎児血清を用いて Kupffer 細胞を分離する方法によつて不要成分を除去する事に成功したと報告している。今後臨床応用の面で検討されるべき方法と考える。

耳静脈を介して注入されたラベル同種脾細胞は先ず肺に集積する筈であるが、24時間後には1.8%が残存

しているのみである事から、著者の実験において脾細胞の Recipient 血管内での凝集現象はおこらなかった事が推定される。この結果は Roser の Kupffer 細胞を用いた実験とよく一致しており、脾細胞は急速に肺から放出されていく様である。その後、脾、肝、腎等に集積するか、肝に34.5%摂取されていたが、この値は Kupffer 細胞や腹腔喰細胞等の値に比して低いが、この原因は細胞の分離法に関係があるものと想像される。但し、肝の平均値の標準誤差は6.39を示し、信用度は余り高くなく、今後更に多数の症例について検討する事が必要であろう。脾の蓄積率1.8%は他の細胞を用いた場合と略一致する値であつた。Roser等は脾、肝、肺の3臓器以外では有意の値を得られなかったと述べているが著者の成績では腎に2.8%集積していた点が異なるけれども、リンパ節では有意の値を示さなかった点は一致している。臓器全重量に対する分布百分率から見ると肝において大量に摂取されている事は脾細胞、Kupffer 細胞、腹腔喰細胞、肺喰細胞及び骨髓細胞等のいずれを用いた実験にも共通して認められる傾向である。

一方、単位重量当りの放射線量に換算して各臓器間の放射能比を検討する事によつて単位重量当りの Macrophage 分布密度をみると脾、肝、肺、腎の順になつている事がわかる。

他方、臓器移植後におこる拒否反応に関しては細胞性抗体が主役を果している事及びリンパ組織がその中枢的役割を演じている事は今日では広く認められている。従つて拒否反応を抑制する目的で Recipient のリンパ組織の機能を破壊する方法が種々考えられ、現在では臨床的に代謝拮抗剤が主として用いられ、或る程度の生着延長が認められているが、副作用が強い為に充分な効果をあげ得ない現状である。更に移植臓器の生着期間延長をはかる為には薬剤以外の方法によつて免疫反応抑制をはからねばならない。この目的には McLoren¹⁰⁾, Gowland¹¹⁾等によれば Host の免疫寛容状態の獲得が一つの手段であると述べている。かかる手段の一つとして鈴木¹²⁾, Martinez¹³⁾等は Recipient に予めイムランを投与して免疫能力を低下させておいて、Donor のリンパ組織細胞を注入し(Recipient内で注入細胞が生存増殖することが免疫学的寛容を得る為に必要と考えて、肺移植時に Donor 血液とともに Donor 脾細胞浮遊液を静脈内に注入する方法を試みて平均生着日数を対照群に比し7.2日延長させ得たと報告している。しかし、この方法では術後77日目に拒否反応の

Crisis を示した為、更に摘脾を加えた群では生着期間が平均1.0日延長したと述べているが、術後感染の頻度が高かつた事が問題となる。著者の実験成績からみて同種脾細胞の注入にさいし Recipient の脾臓を摘出することは、注入脾細胞の生存をはかる上に有意義ではあるが、分布率が平均1.8%と低く、肺、腎も略同様の分布率を示し、肝では約20倍を示す事からみて生存率をより延長させるにはこれら臓器の網内系細胞の Block が必要と考えられ今後更に研究を要する問題である。

癌の免疫療法の一つとして、同種脾細胞を移入して癌細胞の生育を抑制する試みが報告され、実験的にはある程度の効果をあげている様であるが、この場合本実験の成績からみて脾細胞を経静脈的に投与すると Recipient の脾、肝、肺、腎等に大部分が蓄積されてしまい、目標とする癌細胞との接触が望めない為効果がないと推定される。従つて、癌病巣局所への移入が必要と考えられる。

結 語

^{51}Cr にてラベルした同種脾細胞を静脈内に注入し、24時間後に脾、肝、肺、腎、リンパ節の放射線量を測定した。各10例の平均で1.8%が脾に、34.5%が肝に、1.8%が肺に、2.8%が腎に分布しており、リンパ節は有意の値を示さなかつた、脾、肝、肺、腎の4臓器で合計38.9%を占めており Kupffer 細胞、肺胞嚥細胞、腹腔嚥細胞及び骨髓細胞の分布と比較して類似の傾向を示すが、脾、肝の値は他の細胞に比し低い値を示す。これは細胞の分離方法により生じた差異と考えられる。一方、単位重量当りの各臓器の放射能比は分布密度の大なるものから脾、肝、肺、腎の順になる。これらの結果を基に同種脾細胞の静脈内注入の臨床的応用について若干の文献的考察を加えた。

文 献

- 1) Roser, B.: The distribution of intravenously injected peritoneal macrophages in the mouse.

- Australian J. Exp. Biol. Med. Sci. **43** : 553, 1965.
- 2) Russell, P. and Roser, B.: The distribution and behavior of intravenously injected pulmonary alveolar macrophages in the mouse. Australian J. Exp. Biol. Med. Sci., **44** : 629, 1966.
- 3) Gregusova, V. and Hupka, S.: On the distribution of ^{51}Cr labelled bone marrow cells in irradiated rats. Neoplasma, **8** : 577, 1961.
- 4) Roser, B.: The distribution of intravenously injected Kupffer cells in the mouse. J. R. E. S., **5** : 455, 1968.
- 5) 小山良修: 動物実験手技, 東京, 協同医書出版, 昭33.
- 6) Howard, J. G. and Miller, T. F. A. P.: Some similarities between the neonatal Thymectomy Syndrome and Graft-versus-Host Disease. J. R. E. S., **1** : 369, 1964.
- 7) Boeryd, B., Eriksson, O., Knutson, F., Lundin, P. M. and Norrby, K.: On the viability of tumor cells in artificially produced suspensions. Acta pathol. Microbiol. Scand., **65** : 514, 1965.
- 8) St. George, S., Friedman, M., and Byers, S. O.: Mass separation of reticuloendothelial and parenchymal cells of rat's liver. Science, **120** : 463, 1954.
- 9) Shortman, K.: The analysis of lymphocyte populations by density gradient centrifugation. Med. Res., **1** : 162, 1965.
- 10) McLaren, A.: Induction of tolerance to skin homografts in adult mice treated with 6-Mercaptopurine. Transpl. Bull., **28** : 479, 1961.
- 11) Gowland, C.: Induction of transplantation tolerance in adult animals. Brit. Med. Bull., **21** : 123, 1965.
- 12) 鈴木千賀志. 他: 同種肺移植実験における抗免疫剤および Donor脾細胞注入による免疫反応抑制効果について. 移植, **2** : 62, 1967.
- 13) Martinez, C., Smith, J. M., and Good, R. A.: Production of immunological tolerance in mice after repeated injection of disrupted spleen cells. J. Exp. Med., **118** : 743, 1963.